云 南 植 物 研 究 2009, 31 (1): 15～20
Acta Botanica Yunnanica DOI: 10.3724 SP.J.1143.2009.08074

温光敏核不育水稻 N28S 无花粉败育的显微结构观察

彭海峰[1], 万邦惠[2], 张桂权[2], 陆燕鹏[2], 周国权[1], 陈雄辉[2]
(1 华南农业大学生命科学学院, 广东 广州 510642; 2 华南农业大学农学院, 广东 广州 510642)

摘要: 采用石蜡切片和荧光显微技术观察了温光敏核不育水稻 N28S 无花粉败育过程中的显微结构变化, 结果显示: N28S 的小孢子母细胞形成后细胞质变得稀薄, 一部分不能进行减数分裂, 一部分减数分裂阻滞在细线期或胞质分裂异常, 最终所有细胞液泡化解体消失。在此过程中, 还观察到小孢子母细胞在细线期胼胝质壁不产生或提早消失, 以及小孢子发育后期花药壁绒毡层的异常解体。认为 N28S 的无花粉败育是由小孢子母细胞的细胞质异常引起的, 胼胝质壁和绒毡层的异常是结果而不是原因。

关键词: 水稻; 温光敏核不育性; 无花粉败育; 显微结构
中图分类号: Q 944 **文献标识码**: A **文章编号**: 0253-2700 (2009) 01-015-06

Microstructure Observations of Pollenless Abortion in Thermo- and Photoperiod-sensitive Genic Male Sterile Line N28S in Rice (*Oryza sativa*)

PENG Hai-Feng[1], WAN Bang-Hui[2], ZHANG Gui-Quan[2], LU Yan-Peng[2], ZHOU Guo-Quan[1], CHEN Xiong-Hui[2**]
(1 *College of Life Science*, *South China Agricultural University*, Guangzhou 510642, China;
2 *College of Agriculture*, *South China Agricultural University*, Guangzhou 510642, China)

Abstract: Using paraffin section method and fluorescence microscopy, anther microstructure changes of pollenless abortion were observed in thermo- and photoperiod-sensitive genic male sterile line N28S in rice. The results showed that the microsporocytes of N28S had a reduced cytoplasm. Some microsporocytes didn't undergo meiosis, the other microsporocytes arrested meiotic division at the leptotene stage of meiosis or underwent abnormal cytokinesis. All abnormal microsporocytes and meiotic products became vacuolate and eventually degenerated, leaving empty anther locules. Moreover, the absence or premature degradation of callose wall around the microsporocytes and the abnormal degradation of tapetum in the microspore development stage were also been observed. It is suggested that the abnormal behaviour of callose and tapetum may be a consequence of a deviation in microsporocyte development, and the pollenless abortion of N28S is possibly attributed to microsporocytes with reduced cytoplasm.

Key words: Rice; Thermo- and photoperiod-sensitive genic male sterility; Pollenless abortion; Microstructure

光温敏核不育水稻的发现 (石明松, 1985), 使两系法利用水稻杂种优势成为可能。多年来, 人们从光温生态、生理生化、细胞学、遗传学和分子生物学等不同角度开展了大量研究, 并取得重大进展 (卢兴桂等, 2001)。对于光温敏核不育水稻花粉败育的细胞学研究, 是将雄性不育的分子水平研究和个体调控育性变化的研究联系起来的中间环节, 是全面认识不育基因调控花粉育

基金项目: 广东省自然科学基金 (05006667)
通讯作者: Author for correspondence; E-mail: chen3252@scau.edu.cn
收稿日期: 2008-04-24, 2008-08-22 接受发表
作者简介: 彭海峰 (1972-) 女, 副教授, 主要从事植物发育生物学以及水稻杂种优势利用研究。

性的基础，对光温敏核不育机理的阐明有很大帮助（谢潮添等，2006）。目前生产上广泛利用的典败型不育系，前人已从显微结构（王台和童哲，1992）、超微结构（利容千等，1993；孙俊和朱英国，1995；Feng等，2000）以及细胞化学（梅建峰等，1997；Tian等，1998；关和新和朱英国，2002）等方面对其花粉败育过程的变化进行了详细的研究，并已基本明确了其花药及花粉发育发生障碍的主要时期、部位和细胞结构变化特点。而对于无花粉型不育系，有关其无花粉败育过程的系统细胞学研究资料却非常少（彭海峰等，2006；Ku等，2003）。为此，作者在对温敏核不育水稻籼S无花粉败育过程压片观察的基础上，进一步对温光敏核不育水稻N28S的无花粉败育过程进行系统的切片观察，以探讨光温敏核不育水稻无花粉败育的显微结构特点及无花粉形成的细胞学原因，从而丰富光温敏核不育水稻的细胞学资料，为全面认识光温敏核不育机理奠定基础。

1 材料与方法

以籼型常规水稻籼黄占的正常花粉发育过程为对照，采用爱氏苏木精整染或铁矾-海氏苏木精片染的常规石蜡切片法（王灶安，1992），对籼型温光敏核不育水稻N28S的无花粉败育过程进行显微结构观察，并采用苯胺蓝荧光染色法观察胼胝质的变化（胡适宜，1993）。对于N28S花药发育时期的确定，是以水稻小穗长度和正常花粉发育分期的对应关系以及不同分期的正常花药结构特征为依据。

2 结果与分析

2.1 籼黄占的花粉形成与发育过程

减数分裂前，籼黄占的小孢子母细胞呈扇形，紧密排列于花粉囊室内，细胞核较大，核仁明显，且细胞质浓厚（图1：1）。减数分裂开始后，细线期小孢子母细胞的丝状染色体成团聚集在核仁的一侧（图1：2），并且向心面开始形成胼胝质壁，在花粉囊室中央沉积较厚，呈星状（图1：11）。随后，花粉囊室中央的胼胝质溶解，小孢子母细胞彼此分离，并且胼胝质壁逐渐向垂周壁扩展（图1：12）。进入粗线期，小孢子母细胞变为椭圆形，染色体成条状（图1：3）。至终变期，染色体极度缩短成颗粒状（图1：4）。经过进一步发育形成四分体（图1：5）。随着四分体胼胝质壁的溶解，小孢子被释放出来，早期小孢子呈圆形，体积较小，核居中，壁较薄，细胞质均匀（图1：6）。之后，小孢子体积增大，细胞质发生液泡化，核偏离中央，外壁形成（图1：7）。至单核晚期，形成一个中央大液泡，将细胞核挤向周边（图1：8）。接着进行一次有丝分裂形成二核花粉（图1：9），伴随内含物的增多，又进行一次有丝分裂发育为成熟的三核花粉（图1：10）。

在小孢子形成和发育过程中，花药壁也发生了明显的变化。小孢子母细胞时期，花药壁分化为四层，从外到内依次是：表皮、药室内壁（纤维层）、中层和绒毡层（图1：1）。进入减数分裂期，中层细胞变得狭长，核凝聚成长条状；绒毡层细胞的原生质体收缩，径向出现“空腔”（图1：2～6）。随着小孢子的发育，中层逐渐解体消失（图1：7～10），绒毡层由深染的连续带状（图1：7），转变成凹凸不平的山丘状（图1：8），进入二核期后，绒毡层细胞的径向厚度变得更加薄（图1：9），至花粉完全成熟时，绒毡层消失，药壁只剩下表皮和纤维层（图1：11）。

2.2 N28S的无花粉败育过程

减数分裂前N28S的小孢子母细胞基本正常（图2：1）。进入相当于籼黄占的减数分裂时期，小孢子母细胞的细胞质变得稀薄，之后主要有两条发育途径：一条是稀薄化严重的小孢子母细胞（图2：2），没有在花粉囊室中央沉积星状胼胝质（图2：17），也没有进行减数分裂，而是液泡化降解（图2：3）；另一条是稀薄化不太严重的小孢子母细胞进入减数分裂，在细线期早期可观察到花粉囊室中央星状胼胝质的沉积（图2：18），但很快消失（图2：19），随后小孢子母细胞停滞在细线期降解（图2：4），或完成核分裂而胞质分裂异常，产生形态多样的异常小孢子（图2：5），包括粘连未分离的四分体小孢子（图2：6，7）。当进入相当于籼黄占的小孢子发育时期后，小孢子液泡化降解，期间可见有的小孢子进行了无丝分裂（图2：8～13）。随着进一步发育，花粉囊室内的细胞全部解体消失，成熟花药内没有花粉产生（图2：16）。

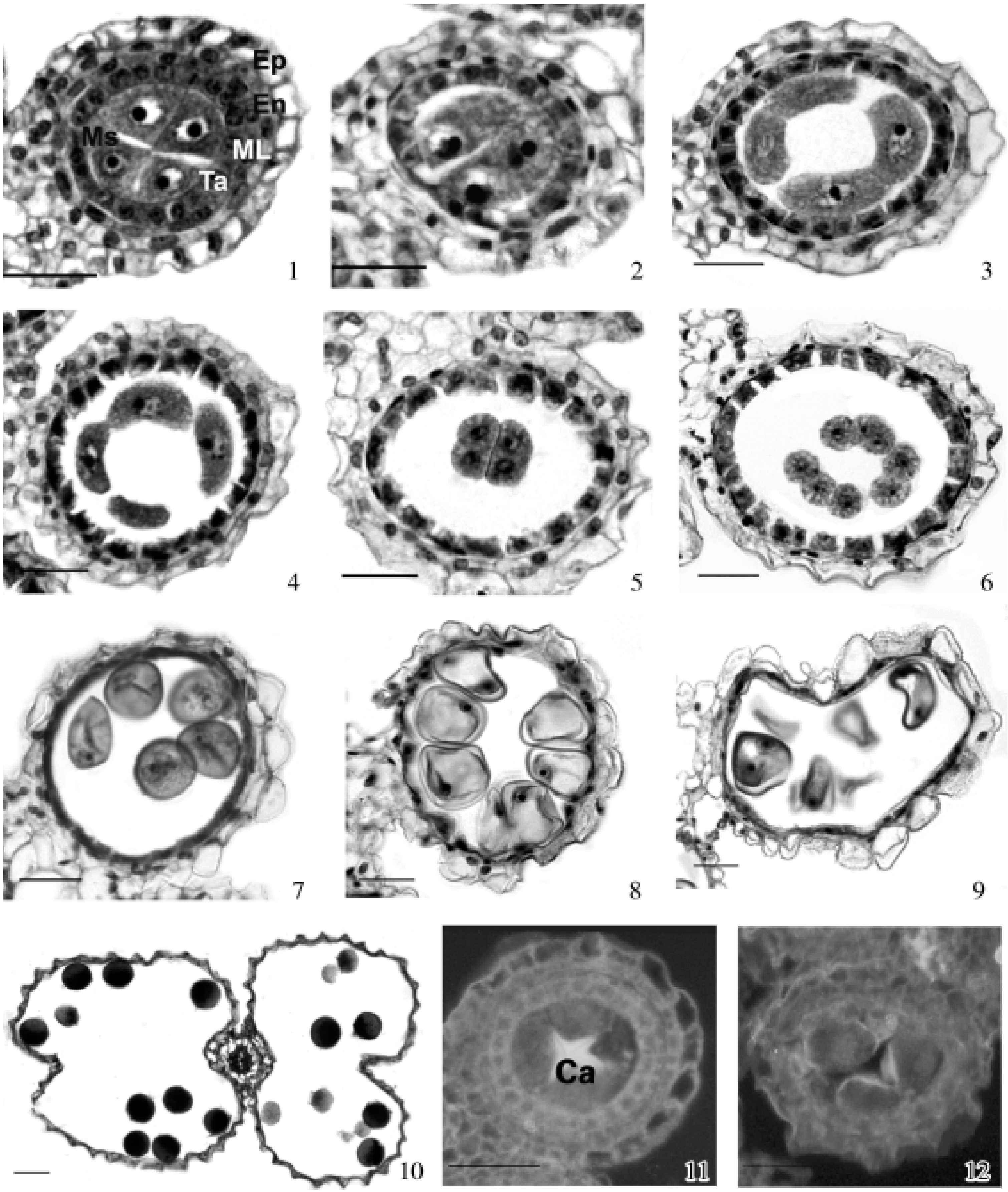

图 1 籼黄占的小孢子形成和发育过程

Fig. 1 Microsporogenesis and microgametogenesis of Xianhuangzhan

1～10 . **籼黄占不同时期的花药横切面照片**：1 . **小孢子母细胞时期**；2 . **减数分裂前期I细线期**；3 . **减数分裂前期I粗线期**；4 . **减数分裂前期I终变期**；5 . **四分体时期**；6 . **刚从四分体游离出的小孢子**；7 . **单核小孢子中期**；8 . **单核小孢子晚期**；9 . **二核花粉期**；10 . **成熟花粉期**。11～12 . **苯胺蓝荧光染色的减数分裂前期I细线期的花药横切片，胼胝质在紫外激发光下呈现黄绿色荧光**：11 . **减数分裂前期I早细线期，籼黄占小孢子母细胞的向心壁沉积胼胝质**；12 . **减数分裂前期I晚细线期，籼黄占小孢子母细胞的胼胝质壁向垂周壁扩展。**

Ms . **小孢子母细胞**；Ep . **表皮**；En . **药室内壁**；ML . **中层**；Ta . **绒毡层**；Ca . **胼胝质** . **标尺为** 20 μm

1 - 10 . The transverse section of Xianhuangzhan anther at different development stages: 1 . At microspore mother cell stage; 2 . At leptotene stage of meiotic prophase Ⅰ; 3 . At pachytene stage of meiotic prophase Ⅰ; 4 . At diakinesis stage of meiotic prophase Ⅰ; 5 . At meiotic tetrad stage; 6 . At early uninucleate microspores stage; 7 . At middle uninucleate microspore stage; 8 . At late uninucleate microspore stage; 9 . At binucleate microspore stage; 10 . At mature pollen stage; 11 - 12 . The transverse section of Xianhuangzhan anther stained by aniline blue and illuminated by UV at leptotene stage of meiotic prophase Ⅰ, callose deposition is shown as green-yellow fluorescence: 11 . At early leptotene stage of meiotic prophase Ⅰ, microsporocytes deposit callose in centripetal wall . 12 . At late leptotene stage of meiotic prophase Ⅰ, microsporocytes expand callose wall in the anticlinal direction .

Ms . Microsporocyte; Ep . Epiderm; En . Endothecium; ML . Middle layer; Ta . Tapetum; Ca . Callose . Bar = 20 μm

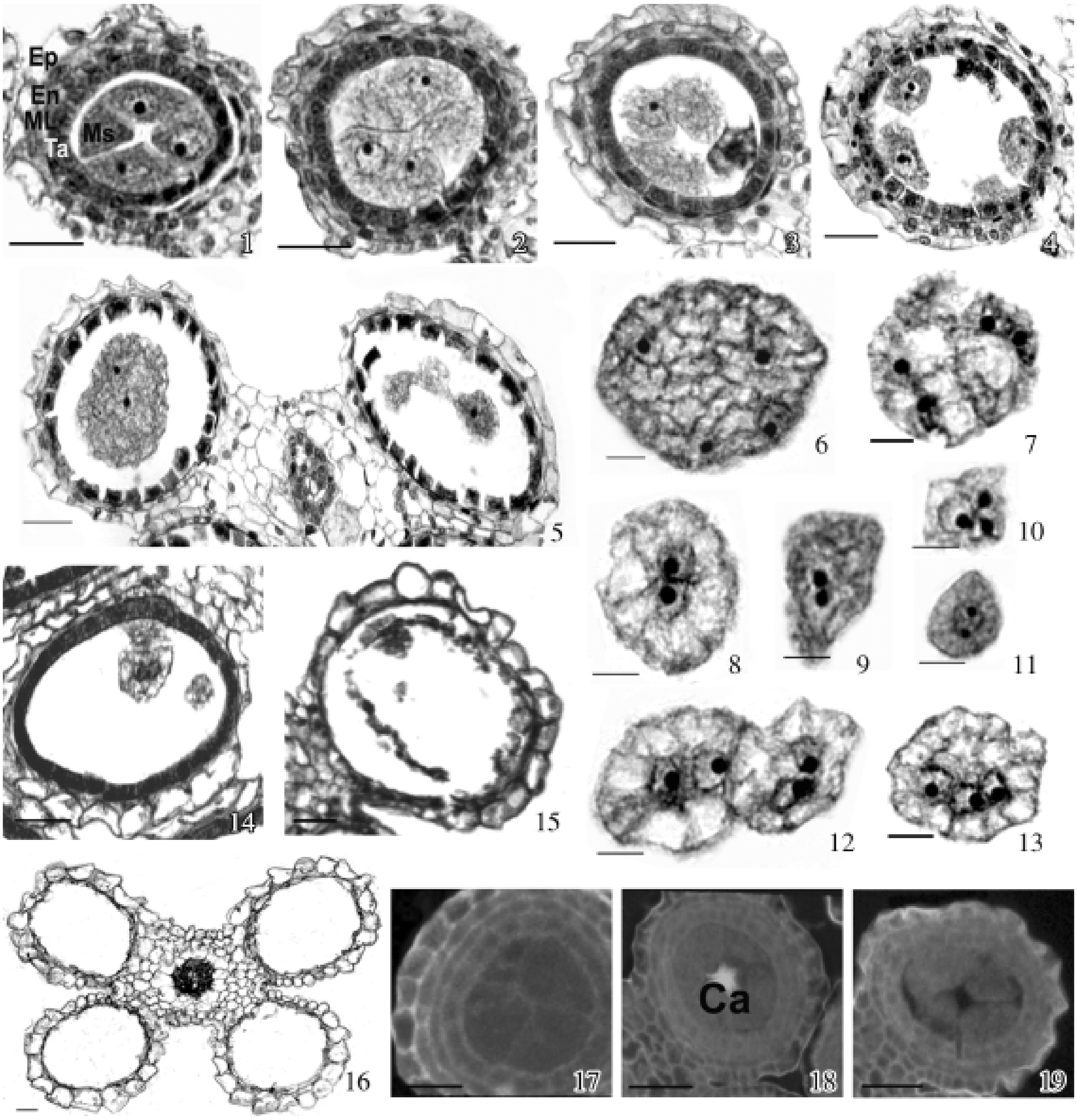

图2 N28S的无花粉败育过程

Fig.2 Pollenless abortion process of N28S

1～5, 14～19 .N28S **不同时期的花药横切面照片**, 6～13 **来自花药横切片的药室内细胞** (1～7 **相当于籼黄占的小孢子发生阶段**; 8～16 **相当于籼黄占的小孢子发育阶段**): 1 .**基本正常的小孢子母细胞**; 2 .**细胞质严重稀薄化的小孢子母细胞**; 3 .**小孢子母细胞彼此分离, 有些液泡化降解**; 4 .**进入减数分裂的小孢子母细胞停滞在细线期**; 5 .**花粉囊室内具有大小不同、核数不等的细胞**; 6～7 .**四分体小孢子粘连融合**; 8～13 .**小孢子的液泡化与无丝分裂**; 14 .**花药壁绒毡层增厚为深染的带状**; 15 .**花药壁绒毡层崩解**; 16 .**花药成熟时没有花粉产生。**17～19 .**苯胺蓝荧光染色的减数分裂前期Ⅰ细线期的花药横切片, 胼胝质在紫外激发光下呈现黄绿色荧光**: 17 .**细胞质稀薄严重的小孢子母细胞没有星状胼胝质沉积**; 18～19 .**细胞质稀薄程度轻的小孢子母细胞有星状胼胝质沉积, 但很快消失。**

Ms .**小孢子母细胞**; Ep .**表皮**; En .**药室内壁**; ML .**中层**; Ta .**绒毡层**; Ca .**胼胝质** .1～5, 14～18 **标尺为** 20 μm, 6～13 **标尺为** 10 μm

1-5, 14-19 .The transverse section of N28S anther at different development stages, 6-13 .Cells derived from the transverse section of N28S anther (1-7 the stages corresponding to microsporogenesis of xianhuangzhan; 8-16 the stages corresponding to microgametogenesis of xianhuangzhan): 1 .Basically normal microsporocytes; 2 .Microsporocytes with badly reduced cytoplasm; 3 .Some segregate microsporocytes become vacuolate and degrade; 4 .The development of microsporocyte is arrested at leptotene stage of meiotic prophse Ⅰ; 5 .Abnormal cells of different size with variable numbers of nuclei in anther locules .6-7 .Four microspores cohesion together due to the absence of cytokinesis during meiosis .8-13 .The microspores become vacuolate and underdo amitosis; 14 .Incrassate and continuous tapetum; 15 .The avalanche of tapetum near anthesis; 16 .Mature anthers is devoid of pollen; 17-19 .The transverse section of N28S anther stained by aniline blue and illuminated by UV at leptotene stage of meiotic prophase Ⅰ, callose deposition is shown as green-yellow fluorescence: 17 .No callose is deposited in centripetal wall of the microsporocytes with badly reduced cytoplasm at leptotene stage; 18-19 .The microsporocytes with slightly reduced cytoplasm deposite asteriate callose at leptotene stage, but soon disappear .

Ms .Microsporocyte; Ep .Epiderm; En .Endothecium; ML .Middle layer; Ta .Tapetum; Ca .Callose .1-5, 14-18 Bar = 20 μm; 6-13 Bar = 10 μm

在 N28S 的花药发育过程中，药壁组织中的绒毡层表现异常。在相当于籼黄占小孢子发育的时期，N28S 的绒毡层没有类似于籼黄占径向厚度逐渐变薄而渐进解体，而是增厚为深染的带状(图 2：14)，当花药接近成熟时崩解（图 2：15)，最后消失（图 2：16)。

3　讨论

一般认为，大多数被子植物的小孢子母细胞进入减数分裂时合成胼胝质壁，在减数分裂结束后胼胝质壁溶解，释放游离的小孢子（Scott 等，2004)。许多研究表明，胼胝质壁的异常会导致雄性不育，如 Abramova 等（2003）和 Sheridan 等(1999）对玉米突变体、Dawson 等（1993）和 Fei 等（1999）对拟南芥突变体、Chen 等（2006）对落羽杉以及 Worrall 等（1992）对转基因烟草的雄性不育性的细胞学研究。在这些研究报道中，有的研究表明胼胝质壁不产生、沉积异常或提早降解，都会引起减数分裂异常（Abramova 等，2003；Dawson 等，1993；Fei and Sawhney，1999；Sheridan 等，1999)，表现为不进行减数分裂而进行有丝分裂，或者进入减数分裂却停滞于前期 I，或者胞质分裂异常等；有的研究则表明，胼胝质壁的提早溶解不影响减数分裂的发生，而是影响小孢子外壁的形成（Worrall 等，1992；Chen 等，2006)，从而导致雄性不育。但也有研究指出胼胝质缺少是突变的一个结果而不是原因，如 Prison 等（1996）根据拟南芥突变体 7593 和 7219 与其他胼胝质缺少的突变体在小孢子发生和发育过程中有不同的异常表现，认为 7593 和 7219 的主要缺陷不在于胼胝质的产生异常，而在于更早的发育阶段。本研究对无花粉型温光敏核不育水稻 N28S 的观察结果显示，减数分裂期间小孢子母细胞的细胞质、胼胝质沉积、减数分裂行为均表现异常。由于减数分裂时由小孢子母细胞合成或分泌胼胝质壁（陈祖铿等，1988；李师翁，1998；吕世友等，2001)，因此小孢子母细胞的细胞质异常很可能会引起其胼胝质壁的异常，而小孢子母细胞的细胞质稀薄化与胼胝质壁异常又都可能引起减数分裂的异常。推测温光敏核不育水稻 N28S 的无花粉败育可能是不育基因与环境互作，引起小孢子母细胞的细胞质异常导致的，胼胝质壁沉积和减数分裂的异常是一个结果，与 Prison 等（1996）的观点相似。

绒毡层是花药壁的最内层细胞，花粉与紧邻的绒毡层有着直接的物质与信息交流。许多水稻雄性不育材料的细胞学研究结果显示花粉败育过程中常伴随有绒毡层不适时解体的异常变化（王台和童哲，1992；利容千等，1993；孙俊和朱英国，1995；贺国良等，2001；贺浩华等，2002；关和新和朱英国，2002；Ku 等，2003；陈小军等，2005；Li 等，2006)。但也有一些水稻雄性不育材料，其绒毡层发育与正常水稻基本一致，花粉败育与绒毡层没有直接关系（Feng 等，2000)。在本研究中，N28S 的绒毡层尽管在相当于正常水稻的小孢子发育时期表现为延迟解体，但由于其异常的时间滞后于小孢子母细胞，所以也被认为是小孢子母细胞异常发育的结果。

本研究中 N28S 的败育过程与无花粉型温敏核不育水稻籼 S 相似，主要是由于减数分裂时期小孢子母细胞的细胞质异常而不能进行正常的减数分裂引起（彭海峰等，2006)。这与无花粉型温敏核不育水稻 95850ms 不同，后者的败育主要是由绒毡层细胞提早程序性死亡，在四分体时期明显液泡化，引起小孢子外壁发育不良而破裂消亡导致（Ku 等，2003)。但总的来说，无花粉型不育系比典败型不育系的败育时期早，败育程度彻底，花粉育性恢复难。在不育起点温度相同的情况下，无花粉型不育系的不育性可能会更加稳定，这对降低异常低温导致的制种风险是有利的。在不育系选育时，除考虑不育起点温度要低外，无花粉型的败育方式是否也可作为不育性稳定的细胞形态学指标，将有待于进一步的低温耐受度研究。

致谢　华南农业大学吴鸿教授和刘向东教授在显微观察与摄影方面提供便利和指导。

〔参　考　文　献〕

王灶安，1992．植物显微技术［M］．北京：农业出版社，1—35

卢兴桂，顾铭洪，李成荃等，2001．两系杂交水稻理论与技术［M］．北京：科学出版社，1—224

Abramova LI，Avalkina NA，Golubeva EA *et al.*，2003．Synthesis and deposition of callose in anthers and ovules of meiotic mutants of maize

(*Zea mays*) [J]. *Russian Journal Plant Physiology*, 50 (3): 366—372

Chen SH, Chung NJ, Wang YN *et al.*, 2006. Study of male sterility in *Taiwania cryptomerioides* Hayata (Taxodiaceae) [J]. *Protoplasma*, 228: 137—144

Chen XJ (陈小军), Liu SN (刘树楠), Wei L (魏磊) *et al.*, 2005. The calciun distribution in the anther of cytoplasmic male sterile line of yunnan purple rice during anther dexelopment [J]. *Journal of Wuhan Botanical Research* (武汉植物研究), 23 (2): 101—106

Chen ZK (陈祖铿), Zhou F (周馥), Wang FX (王伏雄), 1988. Investigation of the development of male gametophyte in *Anmearrhean asphodeloides* [J]. *Acta Botanica Sinica* (植物学报), 30 (6): 569—573

Dawson J, Wilson ZA, Aarts MGM *et al.*, 1993. Microspore and pollen development in six male-sterile mutant of *Arabidopsis thaliana* [J]. *Canada Journal of Botany*, 71: 629—638

Fei H, Sawhney VK, 1999. *MS*32-regulated timing of callose degradation during microsporogenesis in *Arabidopsis* is associated with the accumulation of stacked rough ER in tapetal cells [J]. *Sex Plant Report*, 12: 188—193

Feng JH, Lu YG, Liu XD, 2000. Cytological mechanism of pollen abortion in photoperiod temperature sensitive genic male sterile line Peiai 64S in rice (*Oryza sativa* L.) [J]. *Chinese Journal Rice Science*, 14 (1): 7—14

Guan HX (关和新), Zhu YG (朱英国), 2002. Studies on ATPase-localization in anthers of photoperiod- sensitive genic male-sterile rice [J]. *Scientia Agricultura Sinica* (中国农业科学), 35 (9): 1040—1043

He GL (贺国良), He HH (贺浩华), Liu YB (刘宜柏) *et al.*, 2001. The Cytological study of photoperiod-sensitive genic sterile rice Nongken58S [J]. *Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis* (江西农业大学学报), 23 (1): 24—28

He HH (贺浩华), He GL (贺国良), Zhu CL (朱昌兰) *et al.*, 2002. The ultra structural study of pollen abort ion in Ping xiang dominant genic male sterile rice [J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica* (西北植物学报), 22 (6): 1401—1405

Hu SY (胡适宜), 1993. Method of examination on pollen developmental stage and identification of the pollen wall composition [J]. *Chinese Bulletin of Botany* (植物学通报), 10 (3): 51—52

Ku S, Yoon H, Suh HS *et al.*, 2003. Male-sterility of thermosensitive genic male-sterile rice is associated with premature programmed cell death of the tapetum [J]. *Planta*, 217: 559—565

Li N, Zhang DS, Liu HS *et al.*, 2006. The rice tapetum degeneration retardation gene is required for tapetum degradation and anther development [J]. *Plant Cell*, 18: 2999—3014

Li SW (李师翁), 1998. Studies on the development of male- and female-gametophytes and callose deposit dynamics in *Anmearrhean asphodeloides* [J]. *Acta Botanica Yunnanica* (云南植物研究), 20 (1): 71—75

Li RQ (利容千), Wang JB (王建波), Wang XM (汪向明), 1993. Ultrastuctural changes in microsporogenesis and pollen development of photoperiod sensitive genic male-sterile rice under different day length [J]. *Chinese Journal of Rice Science* (中国水稻科学), 7 (2): 65—70

Lü SY (吕世友), Li YF (李彦舫), Chen ZK (陈祖铿) *et al.*, 2001. Review of pollen development [J]. *Chinese Bulletin of Botany* (植物学通报), 18 (3): 340—346

Mei JF (梅建峰), Xu QS (许秋生), Liang CY (梁承邺) *et al.*, 1997. Cytochemistry of anther and microspore development in photo-thermo- sensitive genic male sterile rice [J]. *Journal of Tropical and Subtropical Botany* (热带亚热带植物学报), 5 (2): 74—79

Peng HF (彭海峰), Qiu ZG (邱振国), Chen XH (陈雄辉) *et al.*, 2006. Pollen fertility and cytological observation of a thermo-sensitive genic male sterile line of non-pollen type XianS in rice (*Oryza sativa* L.) [J]. *Acta Ecologica Sinica* (生态学报), 26 (7): 2322—2327

Prison BN, Owen HA, Feldmann KA *et al.*, 1996. Chracterization of three male-sterile mutants of *Arabidopsis thaliana* exhibiting alterations in meiosis [J]. *Sex Plant Report*, 9: 1—16

Scott RJ, Spielman M, Dickinson HG, 2004. Stamen structure and function [J]. *Plant Cell*, 16: 46—60

Sheridan WF, Golubeva EA, Shamrov II *et al.*, 1999. The mac1 mutant alter the development fate of the hypodermal cells and their cellular progeny in the Maize anther [J]. *Genetics*, 153: 933—941

Shi MS (石明松), 1985. Discovering and a preliminary study on the photoperiod sensitive recessive male sterility in rice [J]. *Scientia Agriculturae Sinica* (中国农业科学), 18 (2): 44—48

Sun J (孙俊), Zhu YG (朱英国), 1995. The Ultrastucture of pollen and anther wall in the development of Hubei photoperiod-sensitive genic male- sterile rice [J]. *Acta Agronomica Sinica* (作物学报), 21 (3): 364—367

Tian HQ, Kuang AX, Musgrave ME *et al.*, 1998. Calcium distribution in fertile and sterile anthers of a photoperiod- sensitive genic male-sterile rice [J]. *Planta*, 204: 183—192

Wang T (王台), Tong Z (童哲), 1992. Changs in anther microstructure of the photoperiod-sensitive genic male sterile rice [J]. *Acta Agronomica Sinica* (作物学报), 18 (2): 132—136

Worrall D, Hird DL, Hodge R *et al.*, 1992. Premature dissolution of the microsporocyte callose wall causes male sterility in transgenic tobacco [J]. *Plant Cell*, (4): 759—771

Xie CT (谢潮添), Wei DM (魏冬梅), Tian HQ (田惠桥), 2006. Advances in cell biological research on male sterility of higher plants [J]. *Journal of Plant Physiology and Molecular Biology* (植物生理与分子生物学学报), 32 (1): 17—23